

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده پزشکی

جهت دریافت درجه دکترای عمومی پایان نامه

موضوع:

اثر اسید رتینوئیک روی بقا و تمایز نورونی سلولهای بنیادی فولیکول موی موش صحرایی

اساتید راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده

دکتر محسن سقا

استاد مشاور:

دکتر محمد قاسم گل محمدی

نگارش:

نسیم مساحی اسکوئی

تابستان ۱۳۹۲

شماره پایان نامه

۰۴۵۶

تقدیم به همسر عزیزتر از جانم

که از باران وجودش زندگی ام سبز

تقدیم به پدر و مادر و عمه ی

همچون شمع دلوزم

سرمایه های زندگی ام

و

تقدیم به کوچکی که همواره در وجودم با تپش قلب من تپید

و بالب من خندید

باتشکر از اساتید و طیفه شناس و کوشایم
دکتر نجف زاده و دکتر سقا

که تمام دستاوردهای علمی و تجربی ام را دیون تلاش های ایشانم.

کلیه مراحل این پایان نامه در آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلولهای بنیادی گروه علوم تشریحی و
پاتولوژی انجام شده و بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به عمل می آید.

و تقدیم به تمام معلمین و اساتید و اسوزم که ذهنم را ورق زدند و مرا به امروزی بهتر رسانیدند.

اثر اسید رتینوئیک روی بقا و تمایز نورونی سلولهای بنیادی فولیکول موی موش صحرایی

چکیده: امروزه مطالعات بر روی بیولوژی سلولهای بنیادی متمرکز شده است و امید آن می رود که نتایج حاصل از این تحقیقات نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماریهای غیر قابل علاج داشته باشد. سلولهای بنیادی می توانند از منابع مختلفی مثل منطقه ی بالج فولیکول مو مشتق شوند. منطقه ی بالج فولیکول مو منبعی در دسترس از سلولهای بنیادی با توان تکثیری بالا می باشد. هدف از این مطالعه جداسازی و کشت سلولهای بنیادی فولیکول مو از ناحیه ی بالج فولیکول مو و ارزیابی روشهای مختلف القا تمایز نورونی در سلولهای بنیادی فولیکول مو بود.

مواد و روش ها: ناحیه بالج فولیکول موی موش صحرایی جدا شد و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی EGF، کلراتوکسین و FGF-2 کشت داده شد. اثرات سیتوتوکسیک رتینوئیک اسید با استفاده از $3(5,4-دی میتیل تیزول)-2-5$ دی فنیل تترازولامید بروماید (روش MTT) مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً با استفاده از روش RT-PCR بیان CD34 و Nestin و همچنین Map2 و GFAP به عنوان مارکرهای نورال، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج ما نشان داد که سلولهای بنیادی فولیکول موی تمایز نیافته، نستین و CD34 را که نشانگرهای بنیادی هستند بیان کردند و در سلولهای تیمار شده با رتینوئیک اسید باندهای قوی تری از بیان این مارکرها دیده شد. رتینوئیک اسید در غلظت های بالا منجر به کاهش میزان حیات سلولی شد و در سلولهایی که با دوز FBS یک درصد تیمار شده بودند، نسبت بیان Bax به Bcl2 افزایش یافت. رتینوئیک اسید با غلظت یک میکرومول منجر به تظاهر بیان Map2 و نه بیان GFAP و القا نورونز در سلولهای بنیادی فولیکول مو شد.

نتیجه گیری: یافته های ما بیانگر این بود که سلولهای بیان کننده ی نستین و CD34 در ناحیه ی بالج فولیکول مو، ویژگی های مشابه سلولهای بنیادی را داشتند و توانستند به طور کارآمدی در حضور رتینوئیک اسید (با غلظت یک میکرومول) سلولهای نورونی را ایجاد کنند. این دست آوردها قطعاً یافته ی مهمی برای درمان بیماری های نورودژنراتیو می باشد.

واژگان کلیدی: اسید رتینوئیک - ناحیه بالج فولیکول موش صحرایی - سلول بنیادی - نورون - گلیال -

آپوپتوز - تمایز

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۲-۱-۱	مقدمه و بیان مسئله
۵-۱-۲	اهداف کلی و جزئی
	فصل دوم: بررسی متون گذشته
۷-۱-۲	مورفولوژی پوست انسان
۸-۲-۲	فولیکول مو پلاگ
۸-۳-۲	فولیکول موی سبیل
۹-۴-۲	مورفولوژی فولیکول مو
۹-۵-۲	آناتومی فولیکول مو
۱۰-۶-۲	ساختار و عملکرد فولیکول مو
۱۰-۶-۲-۱	رشد فولیکول مو
۱۲-۶-۲-۲	فولیکول موی بالغ
۱۳-۶-۲-۳	سیکل رشد مو
۱۳-۶-۲-۱-۳	کنترل سیستمیک چرخه ی رشد مو
۱۴-۶-۲-۲-۳	کنترل داخلی رشد فولیکول مو
۱۵-۶-۲-۳-۳	نقش درمال پایپلا در کنترل رشد مو
۱۶-۷-۲	تنظیم کراتینوسیت‌های اپیدرم توسط فاکتورهای رشد
۱۷-۷-۲-۱	فاکتورهای مرتبط با رشد کراتینوسیتها
۱۷-۷-۲-۱-۱	خانواده ی فاکتور رشد اپیدرمال
۱۹-۷-۲-۱-۲	فاکتور رشد فیروبلاستی
۲۰-۷-۲-۱-۳	فاکتور رشد مشابه انسولین
۲۱-۸-۲	سلولهای بنیادی و نقش درمانی آنها
۲۱-۹-۲	سلولهای بنیادی بالغ
۲۲-۹-۲-۱	سلولهای بنیادی فولیکول مو
۲۴-۹-۲-۱-۱	ناحیه بالچ ریش، محل دو دسته از سلولهای بنیادی اپی تلیالی
۲۶-۱۰-۲	سلولهای بیان کننده ی CD34 فولیکول مو

- ۱۱-۲ منطقه ی بالچ منشا سلولهای بیان کننده ی نستین چند پتانسیلی در فولیکول مو..... ۲۸
- ۱۲-۲ منطقه ی بالچ بزرگترین منبع سلولهای بنیادی فولیکول مو چند ظرفیتی بیان کننده ی نستین هستند که می توانند آسیب نخاعی را در مقایسه با درمان پاپیلا ترمیم کنند..... ۳۱
- ۱۳-۲ رتینوئیدهای اندوژن در فولیکول مو..... ۳۲
- ۱۳-۲ رتینوئیدها در فولیکول مو..... ۳۲
- ۱۴-۲ مکانیسم مولکولی عمل رتینوئیدها در پوست..... ۳۷
- ۱۴-۲ گیرنده های هسته ای رتینوئیدها و ژنهای هدف آنها در پوست..... ۳۷
- ۱۴-۲ گیرنده های هسته ای رتینوئیدها..... ۳۸
- ۱۴-۲ گیرنده ی گاما رتینوئیک اسید بطور ترجیحی با ال ترانس رتینوئیک اسید باند میشود..... ۳۹
- ۱۴-۲ ژن های هدف گیرنده های رتینوئید..... ۴۲
- ۱۴-۲ مهار پروتئینی AP-I توسط رسپتورهای رتینوئید..... ۴۴
- ۱۵-۲ مصارف رتینیل استرها..... ۴۶
- ۱۶-۲ بیوستتزال ترانس رتینوئیک اسید..... ۴۶
- ۱۷-۲ متابولیسم رتینوئیدها در پوست انسان..... ۴۸
- ۱۷-۲ استریفیکاسیون رتینول..... ۴۸
- ۱۷-۲ هیدروکسیلاسیون ترانس رتینوئیک اسید..... ۴۹
- ۱۷-۲ خودتنظیمی میزان ترانس رتینوئیک اسید..... ۵۰
- ۱۸-۲ پاسخ کراتینوسیتها به رتینوئیدها در محیط آزمایشگاهی و موجود زنده..... ۵۳
- ۱۸-۲ رتینوئیدها تمایز نهایی کراتینوسیتها کشت یافته را مهار می کند..... ۵۳
- ۱۸-۲ رتینوئیدها منجر به تحریک رشد کراتینوسیتها و تمایز در بدن می گردد..... ۵۴
- ۱۹-۲ سطوح گیرنده های هسته ای رتینوئیدها..... ۵۵
- ۲۰-۲ تاثیر رتینوئیدها بر سلولهای فولیکول مو..... ۵۵
- ۲۱-۲ رتینوئیدها منجر به القای آپوپتوز در سلولهای کراتینوسیتی کشت یافته میشوند..... ۵۷

فصل سوم: مواد و روشهای مطالعه

- ۱-۳ حیوانات مورد استفاده..... ۶۳
- ۲-۳ روش تهیه محیط کشت..... ۶۳
- ۳-۳ نحوه پوشش دادن پلیت با کلاژن..... ۶۴
- ۴-۳ تهیه محلول DispaseII/ CollagenaseI..... ۶۴

- ۵-۳ تهیه Trypsin/EDTA ۶۴
- ۶-۳ جداسازی و کشت سلولهای بنیادی فولیکول موی موش صحرایی ۶۵
- ۱-۶-۳ جدا کردن فولیکول مو ۶۵
- ۲-۶-۳ جهت جدا کردن ناحیه بالج این اقدامات را انجام دادیم ۶۶
- ۳-۶-۳ برای کشت سلولهای ناحیه بالج این مراحل طی شد ۶۶
- ۷-۳ کشت سلولها بصورت کلونال ۶۷
- ۸-۳ تکثیر دادن و پاساژ سلولی ۶۷
- ۹-۳ روش MTT ۶۸
- ۱-۹-۳ تهیه ی محلول MTT ۶۸
- ۲-۹-۳ روش آماده سازی سلولها ۶۸
- ۱۰-۳ بررسی مورفولوژی سلولی ۶۹
- ۱۱-۳ شمای گروه بندی و انجام کشت سلولی ۶۹
- ۱۲-۳ نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمر از (RT-PCR) ۷۱
- ۱-۱۲-۳ استخراج RNA ۷۱
- ۲-۱۲-۳ تعیین غلظت RNA استخراج شده ۷۲
- ۳-۱۲-۳ ساخت cDNA ۷۳
- ۴-۱۲-۳ RT PCR ۷۴
- ۵-۱۲-۳ تهیه ی ژل آگارز ۷۵
- ۱-۵-۱۲-۳ تهیه ی بافر (۵X) TBE ۷۵
- ۲-۵-۱۲-۳ تهیه ی بافر (۰/۵M) EDTA ۷۵
- ۶-۱۲-۳ الکتروفورز محصول RT PCR ۷۶
- ۷-۱۲-۳ ژن های مورد بررسی در این مطالعه ۷۶

فصل چهارم: نتایج مطالعه

- ۱-۴ یافته های کشت سلولی ۷۸
- ۱-۱-۴ مورفولوژی فولیکول موی موش صحرایی ۷۸
- ۲-۱-۴ یافته های مورفولوژیک روز اول کشت سلولهای بالج فولیکول مو ۸۰
- ۳-۱-۴ رشد سلولهای فولیکول مو در محیط کشت ۸۱
- ۴-۱-۴ تریپسینه کردن و کشت سلولها با تراکم کم ۸۲

- ۲-۴ بررسی با روش MTT ۸۳
- ۱-۲-۴ بررسی بقا سلولی ۸۳
- ۲-۲-۴ بررسی مورفولوژیکی سلولها در روش MTT ۸۴
- ۳-۴ مورفولوژی سلولهای پاساژ یافته، روز ۱۴ کشت سلولها قبل از تشکیل گروه ها ۸۶
- ۴-۴ گروه بندی و یافته های مورفولوژیکی در گروههای مختلف ۸۷
- ۱-۴-۴ در گروه ۱ محیط کشت ۸۷
- ۲-۴-۴ در گروه ۲ محیط کشت ۸۸
- ۳-۴-۴ در گروه ۳ محیط کشت ۸۹
- ۴-۴-۴ در گروه ۴ محیط کشت ۹۰
- ۵-۴ یافته های حاصل از RT PCR ۹۱
- ۱-۵-۴ Housekeeping نتایج بیان ژن ۹۲
- ۲-۵-۴ نتایج بیان نشانگرهای بنیادی و تاثیر رتینوئیک اسید بر آن ۹۲
- ۳-۵-۴ نتایج بررسی آپوپتوز و تاثیر رتینوئیک اسید بر آن ۹۳
- ۴-۵-۴ نتایج بررسی تمایز نورال و تاثیر رتینوئیک اسید بر آن ۹۳

فصل پنجم بحث و نتیجه گیری:

- ۱-۵ کشت سلولهای بنیادی فولیکول موی موش و بررسی نتایج خصوصیات مورفولوژیکی و بیولوژیکی ۹۶
- ۲-۵ بررسی نتایج تاثیر رتینوئیک اسید در غلظت های مختلف در بقا سلولی ۹۸
- ۳-۵ بررسی اثر غلظت یک میکرو مول در تمایز سلولهای بالج به صورت مورفولوژیکی و نتایج آن ۱۰۰
- ۴-۵ بررسی اثر غلظت یک میکرو مول در تمایز سلولهای بالج در بیان ژنهای سلولهای بنیادی CD34, Nestine و نتایج آن: ۱۰۱
- ۵-۵ نتایج تمایز سلول های بنیادی به سلولها مشابه نورونی و گلیاهای میلین ساز توسط RT PCR ۱۰۵
- ۶-۵ بررسی میزان آپوپتوز و بقا و نتایج ۱۰۸
- ۷-۵ نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۱۰
- منابع ۱۱۱

فهرست تصاویر

- تصویر ۱-۲ فولیکول سبیل موش ۸
- تصویر ۲-۲ سنتز رتینوئیک اسید در فولیکول مو ۳۴
- تصویر ۳-۲ واکنش عملکردی گیرنده های رتینوئید در پوست انسان ۴۱
- تصویر ۴-۲ خودتنظیمی متابولسم ترانس رتینوئیک اسید در پوست انسان ۵۱
- تصویر ۱-۴ مراحل جداسازی بالچ ۷۸
- تصویر ۲-۴ فولیکولهای جدا شده از موش ۷۹
- تصویر ۳-۴ یافته های مورفولوژیک سلولها در روز اول کشت ۸۰
- تصویر ۴-۴ مورفولوژی سلولها در روز هفت کشت ۸۱
- تصویر ۵-۴ مورفولوژی یک سلول بالچ در حال تقسیم ۸۲
- تصویر ۶-۴ تصویر سلولها بعد از تریپسینه کردن ۸۲
- تصویر ۷-۴ مورفولوژی سلولها در گروههای MTT ۸۴
- تصویر ۸-۴ مورفولوژی سلولها در گروههای MTT ۸۵
- تصویر ۹-۴ مورفولوژی سلولها در روز چهاردهم کشت ۸۶
- تصویر ۱۰-۴ مورفولوژی سلولها در گروه یک ۸۷
- تصویر ۱۱-۴ مورفولوژی سلولها در گروه دوم ۸۸
- تصویر ۱۲-۴ مورفولوژی سلولها در گروه سوم ۸۹
- تصویر ۱۳-۴ مورفولوژی سلولها در گروه چهارم ۹۰
- تصویر ۱۴-۴ یافته های RT PCR ۹۱
- تصویر ۱۵-۴ یافته های RT PCR ۹۲

فهرست نمودار

نمودار ۴-۱ میانگین درصد حیات سلولهای بنیادی فولیکول مو در غلظت های مختلف رتینوئیک

اسید ۸۳

فهرست جداول

جدول ۳-۱ ژنهای بررسی شده در RT PCR ۷۶

اختصارات:

RA: Retinoic Acid
tRA: Trans Retinoic Acid
EGF: Epidermal Growth Factor
FGF: Fibroblast Growth Factor
FBS: Fetal Bovine Serum
IFE: Inter Follicular Epiderm
RAR: Retinoic Acid Receptor
RXR: Retinoid X Receptor
RARE: Retinoic Acid Response Elements
mRNA: Messenger RNA
TG: Trans Glutamine
LRAT: Lecithin Retinol Acyltransferase
GFAP: Glial fibrillary acidic protein
MAP2: Microtubule –associated protein2
Nestin: Neural Progenitor & Hair Follicle Marker
Bcl2: B –Cell Lymphoma 2
BAX: Bcl2 associated X protein
DMEM: Dulbecos modified Eagles Medium
PBS: Phosphate buffered saline
SKP: Skin derived Precursors
EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid
MTT: (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide)

فصل اول

مقدمه و بیان مسئله

۱- مقدمه و بیان مسئله:

چند ی است که مطالعات بر روی بیولوژی سلولهای بنیادی متمرکز شده است و امید آن می رود که نتایج حاصل از این تحقیقات نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماریهای غیر قابل علاج داشته باشد. تاکنون انواع مختلف سلولهای بنیادی از موجودات زنده جدا شده و در کل سلولهای بنیادی شامل دو گروه جنینی و بزرگسال می باشند. تحقیقات بر روی هر دو دسته ی اخیر مهم است و نتایج بدست آمده، در تکنولوژی درمان با سلولهای بنیادی نقش خاص خود را خواهد داشت.

استفاده از سلول های بنیادی موجود در پوست و ضمام آن دریچه تازه ای روی محققین گشوده است، زیرا پوست و ضمام آن مخزن سلولهای بالقوه ای هستند که قابلیت تکثیر، تمایز و تبدیل به سایر سلولها از جمله سلول های عصبی را دارند (۱). اپی تلیوم پوست حاوی فولیکول مو و اپیدرم اطراف آن است، فولیکول مو از غلاف ریشه ای خارجی ، کانال یا غلاف ریشه ای داخلی و تنه مو تشکیل شده است (۲).

در زمان تشکیل فولیکول مو در موش اپیدرم ضخیم می شود و پلاکود ایجاد می کند و بدنال آن، سلولهای درمی زیر اپیدرم تجمع پیدا می کنند و پلاکود اپیدرمی به طرف درم رشد می کند، تا میخ مو ایجاد شود. در اطراف ناحیه متراکم شده درمی، اپی تلیال در حال رشد فولیکول قرار می گیرد تا پاپیلای درمی ایجاد شود. سلولهایی که پاپیلای درمی را احاطه می کنند ماتریکس موئی را می سازند. تنه مو و غلاف ریشه ای داخلی از سلولهای پیش ساز ماتریکس ایجاد می شوند و غده چربی هم نزدیک بخش فوقانی فولیکول مو شکل می گیرد.

در طی فاز کاتازن سلولهای ماتریکس دچار آپوپتوز می شوند، دوسوم تحتانی فولیکول دژنره می شود، بعد از دوره استراحت، تحریکی از ناحیه پاپیلای درمی، سلولهای اپی تلیالی فولیکول را تحریک می کند. با شروع مرحله آناتزن، سلولهای ناحیه بالچ که جزئی از غلاف ریشه ای خارجی و نزدیک محل اتصال عضله ی راست کننده ی مو هستند، تکثیر پیدا می کنند و بخش تحتانی فولیکول را دوباره بوجود می آورند،